

## ID 1128 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO DE BAJO COSTO PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO CONTROL BIOLÓGICO DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A

Gloria Angélica Domínguez-Gutiérrez<sup>a</sup>, Isabelle Gaime-Perraud<sup>b</sup>, Gerardo Saucedo-Castañeda<sup>a</sup>,  
Gabriela M. Rodríguez-Serrano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,

<sup>b</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia

gloria.dominguez.gutierrez@gmail.com, gmrs@xanum.uam.mx

### Resumen

Cuando el café no es procesado adecuadamente existe un problema potencial de contaminación de granos de café por ocratoxina A (OTA) producida por el hongo *Aspergillus carbonarius*. Esto se puede solucionar mediante el control biológico del hongo empleando bacterias ácido lácticas (BAL). Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales exigentes, por lo que en este trabajo se diseña un medio de cultivo de bajo costo para el crecimiento de BAL. El diseño se llevó a cabo mediante la sustitución de dos fuentes de N del medio MRS (Man Rogosa Sharpe) por una fuente de alterna, el extracto de germinado de malta (EGM), Asimismo, mediante un diseño Plackett-Burman (PB) se variaron las concentraciones de otros nutrientes, así como el pH y la temperatura. Las variables de respuesta fueron la productividad y el incremento de productividad de la biomasa de BAL. El EGM resultó ser una fuente alternativa de N eficaz además se encontró que los factores que tienen un mayor efecto sobre la productividad son la concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio.

### Introducción

El café es un producto comercial muy importante para los países productores como México, produce más ganancias que cualquier otro producto de comercio legal. Si el café no es procesado adecuadamente, existe un problema potencial de contaminación por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* productores de la ocratoxina A, la cual tiene efectos negativos contra la salud a largo plazo, para poder contrarrestar este problema se plantea el control biológico mediante el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), pues se ha demostrado que éstas ejercen un efecto inhibitorio sobre la germinación, crecimiento y producción de la OTA [1].

Las BAL tienen requerimientos nutricionales muy exigentes, necesitan carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales para crecer por lo que generalmente se cultivan en medios enriquecidos. El medio de cultivo más usado para el crecimiento de estas bacterias es el MRS (Man Rogosa Sharpe) por su capacidad de proveer los nutrientes necesarios para su crecimiento [2]; sin embargo, es un medio muy caro debido a las fuentes de N que contiene (extracto de carne y proteosa de peptona). Para disminuir los costos del medio es posible reemplazar estas fuentes costosas de N por fuentes de N provenientes de residuos agroindustriales.

Así, el objetivo de este trabajo es diseñar un medio de cultivo de bajo costo empleando una fuente alternativa de nitrógeno (N) (extracto de germinado de malta) con el que se obtengan productividades de crecimiento de BAL semejantes al medio MRS.

## Metodología

### *Microorganismo*

Se utilizó una cepa de *Lactobacillus plantarum* de la colección UAM – IRD (Universidad Autónoma Metropolitana - Institut de Recherche pour le Développement). Las cepas se mantuvieron en glicerol al 30 % (v/v) a -18 °C y se propagaron en un medio esterilizado (autoclave a 121 °C por 15 min) MRS hasta su uso.

### *Preparación del inóculo y fermentación*

Para la preparación del inóculo y el mantenimiento de *L. plantarum*, se realizaron dos subcultivos de las células de la cepa en tubos de ensaye con medio estéril MRS e incubadas a 30 °C por 24 h para obtener una biomasa inicial aproximada de 10<sup>6</sup> UFC/mL. La fermentación se llevó a cabo en tubos cónicos de 15 mL con un inóculo del 10 % v/v.

### *Preparación de la fuente de N alterna*

Debido a que uno de los principales objetivos en el presente trabajo es disminuir los costos de obtención de biomasa de *L. plantarum*, se sustituyeron las fuentes más costosas del medio MRS (extracto de carne y proteosa de peptona no. 3) por extracto de germen de malta (EGM), para prepararlo realizó un germinado de semillas de cebada provenientes de la central de abastos de la CDMX. Posteriormente, los granos y las raíces se secaron a 60 °C por 24 h. Se tamizó para separar a las raíces de los granos. Las raíces se remojaron en agua destilada (100 g materia seca/1 L agua destilada) durante 5 h, a continuación, se filtró con papel Whatman no. 40 y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue empleado para preparar los medios de cultivo en lugar de agua destilada.

### *Diseño Plackett-Burman*

Se formularon medios de cultivo basados en un diseño experimental tipo de Plackett-Burman (PB) con 7 factores (pH, temperatura y concentración de glucosa, acetato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso), resultando 8 corridas, se formularon medios de cultivo control que consistieron en la misma formulación sin la adición del EGM y el medio MRS. En la Tabla 1 se presentan los medios formulados. Todos los medios contenían además extracto de levadura (5 gL<sup>-1</sup>), citrato de amonio (2 gL<sup>-1</sup>) y Tween 80 (1 gL<sup>-1</sup>). La composición del medio MRS consistió en glucosa (20 gL<sup>-1</sup>), peptona (10 gL<sup>-1</sup>), extracto de carne (10 gL<sup>-1</sup>), extracto de levadura (5 gL<sup>-1</sup>), acetato de sodio (5 gL<sup>-1</sup>), citrato de amonio (2 gL<sup>-1</sup>), sulfato de magnesio (0.1 gL<sup>-1</sup>), sulfato de manganeso (0.05 gL<sup>-1</sup>), fosfato dipotasio de hidrógeno (2 gL<sup>-1</sup>) y Tween 80 (1 gL<sup>-1</sup>).

**Tabla 1.** Composición y condiciones de cultivo de los medios de cultivo probados.

Factores del diseño PB	Medios de cultivo							
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Glucosa (gL <sup>-1</sup> )	25	25	25	15	25	25	15	15
Acetato de sodio (gL <sup>-1</sup> )	2	4	4	4	2	4	2	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (gL <sup>-1</sup> )	1	1	2	2	2	1	2	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (gL <sup>-1</sup> )	0.4	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O (gL <sup>-1</sup> )	0.3	0.5	0.3	0.3	0.5	0.5	0.5	0.3
Temperatura (°C)	37	30	37	30	30	37	37	30
pH	7	7	5	7	5	5	7	5

Se realizaron cinéticas de crecimiento para los 8 medios de prueba con sus controles, y 4 medios MRS (1-pH 5, 30 °C, 2-pH 5, 37 °C, 3-pH 7, 30°C, y 4-pH 7, 37°C). Para ello se tomaron muestras por duplicado cada 2 h durante 48 h de cada medio preparado (prueba, control y MRS) y se conservaron en congelación hasta su análisis. Los datos se ajustaron al modelo logístico (ecuación 1 y 2) por minimización de la sumatoria de los errores al cuadrado con la subrutina Solver de Microsoft Excel.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \left[ 1 - \frac{x}{x_{\max}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

$$x = \frac{x_{\max}}{1 + \left[ \left( \frac{x_{\max} - x_0}{x_0} \right)^* \exp(-\mu t) \right]} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $dx$  es la tasa de crecimiento,  $\mu$  es la tasa específica de crecimiento,  $x$  es la concentración de biomasa,  $x_0$  es la concentración de biomasa inicial y  $x_{\max}$  es la concentración de biomasa máxima.

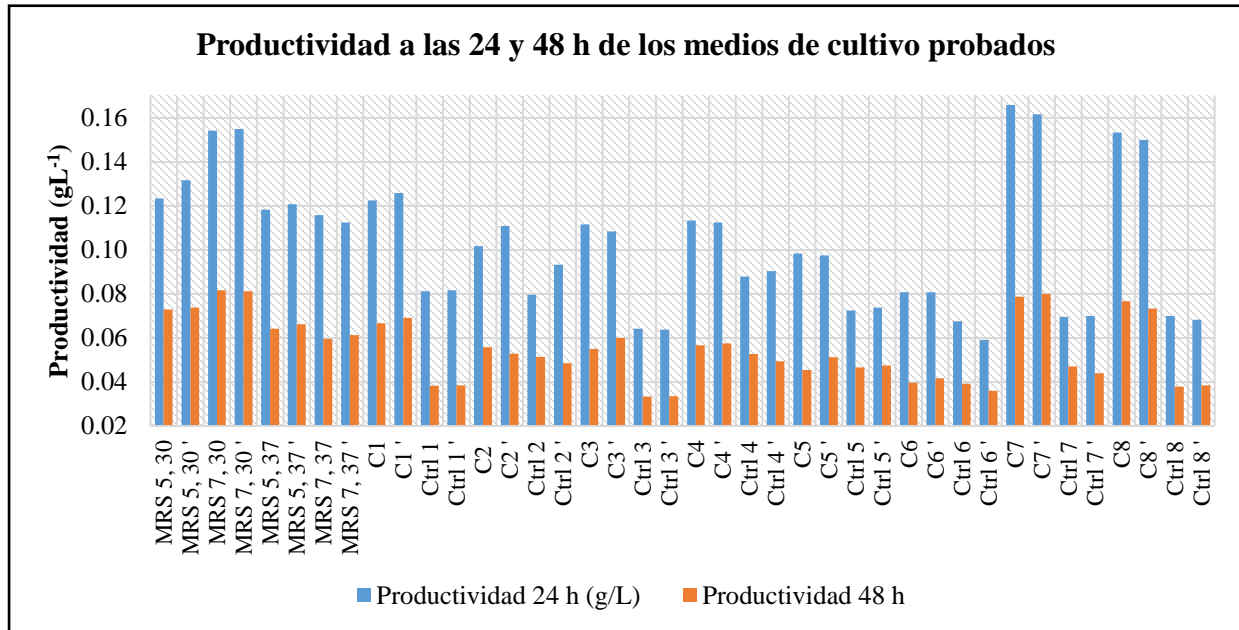
### *Determinación de la concentración de biomasa*

La concentración de biomasa se determinó por el método de peso seco, para ello se centrifugó el contenido de un tubo cónico con 10 mL a las 0, 24 y 48 h a 3000 rpm por 15 min a 4 °C, posteriormente se realizaron 2 lavados con solución salina (NaCl) al 0.9 %, se desechó el sobrenadante. Los tubos con el pellet bacteriano se secaron a 60 °C hasta que se obtuvo peso constante. Con los datos obtenidos se estimó la productividad ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) a las 24 y 48 h del cultivo y el incremento de productividad respecto a los medios de cultivo control. Lo anterior se analizó mediante el software Statgraphics Centurion XVIII para determinar los factores que tenían un efecto significativo sobre las variables de respuesta (Pr e incremento de Pr).

Finalmente, se realizó un análisis del tamaño del vector, para definir los factores con mayor influencia en las variables de respuesta.

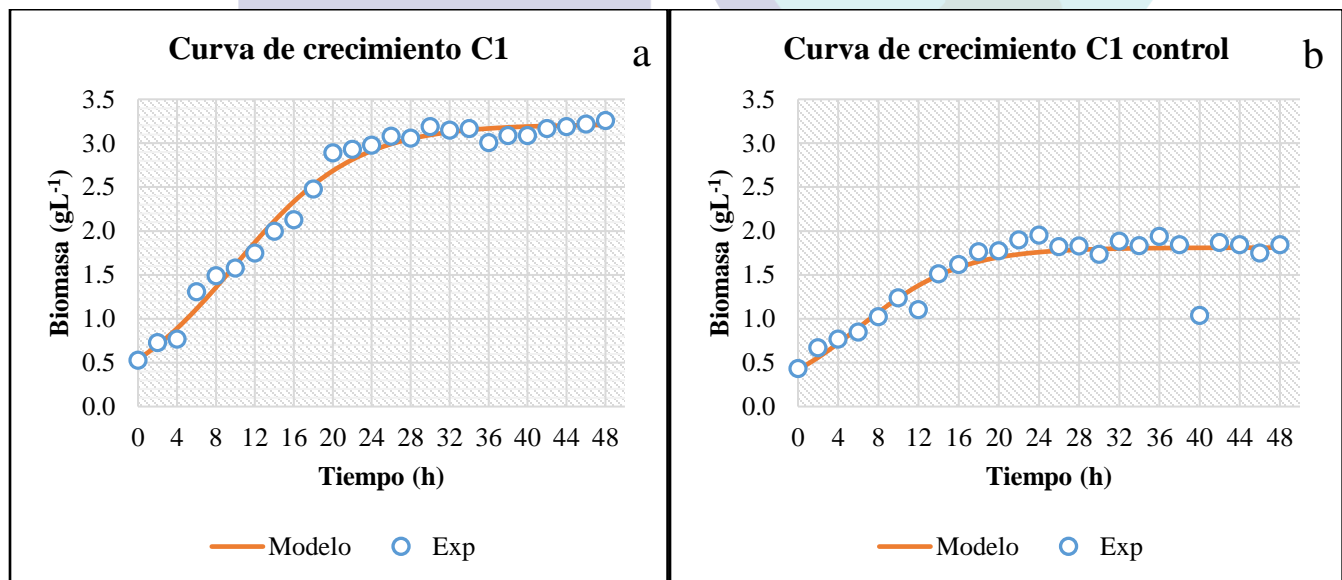
### **Resultados y discusión**

En la Figura 1 se muestra la productividad obtenida a las 24 y 48 h de cada medio (C1-C8) del diseño experimental PB así como de los medios control (Ctrl1-Ctrl8) y del medio MRS. Se observa que hay una mayor productividad a las 24 h que a las 48 h en todos los casos, por lo que es recomendable cosechar las bacterias a las 24 h, además se aprecia que con los medios probados se obtienen mayores productividades que con los controles por lo que la inclusión del EGM sí tiene un efecto positivo en la producción de biomasa. También cabe destacar que con los medios C1, C7 y C8 las productividades son muy semejantes a las obtenidas con el medio MRS.



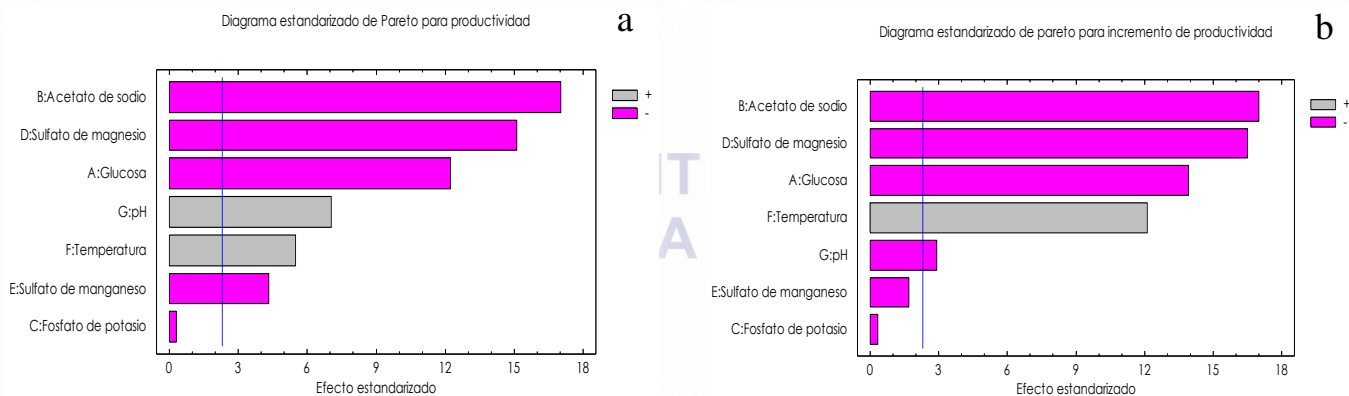
**Figura 1.** Productividad a las 24 y 48 h de *L. plantarum* cultivado en medios de cultivo descritos en la tabla 1. La fermentación se llevó a cabo en tubos cónicos de 10 mL sin agitación y con un inóculo del 10 %.

La Figura 2 muestra la curva de crecimiento del medio C1 que fue en donde se obtuvo el mayor crecimiento, la biomasa obtenida fue de  $3.3 \text{ gL}^{-1}$  que fue la más cercana a la obtenida con el medio MRS ( $4 \text{ gL}^{-1}$ ) incubadas a  $30^\circ\text{C}$  y un pH de 7 (datos no mostrados). Los datos experimentales se señalan con los círculos y las líneas continuas representan el ajuste del modelo logístico. Los parámetros de crecimiento estimados con el modelo fueron  $\mu_{\text{max}}$ , y  $X_{\text{max}}$  siendo  $0.16 \text{ h}^{-1}$  y  $3.2 \text{ gL}^{-1}$  respectivamente para el caso del medio C1.



**Figura 2.** Curva de crecimiento de *L. plantarum* cultivado en a) medio C1 (Tabla 1) y b) C1 control. La fermentación se llevó a cabo en tubos cónicos de 10 mL sin agitación y con un inóculo del 10 %.

La Figura 3 presenta el análisis de Pareto de los resultados del diseño PB. En la Figura 3a se observa que 6 de los 7 factores tienen un efecto significativo sobre la respuesta (productividad de BAL), mientras que en la Figura 3b sólo 5 de 7 factores tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta (incremento de productividad); sin embargo, las variables con mayor efecto para ambos casos son la concentración de sulfato de magnesio, de glucosa y de acetato de sodio ejerciendo además un efecto



negativo sobre las respuestas.

**Figura 3.** Diagrama de Pareto para a) productividad b) incremento de productividad durante el cultivo de BAL

Con los coeficientes de la regresión multilínea obtenidos del diseño de PB se calculó el tamaño del vector, para seleccionar los factores con mayor efecto en el incremento de la productividad de BAL y así seleccionar a un número menor de factores para futuros análisis; los factores que tienen mayor efecto son el acetato de sodio y de sulfato de magnesio.

## Conclusiones

Los medios de cultivo con los que se obtuvieron productividades semejantes a las obtenidas con el medio MRS fueron el C1, C7 y C8 con productividades de 0.13, 0.15 y 0.14  $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  respectivamente. La productividad de BAL en el medio MRS fue de 0.16  $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Además el medio C1 fue en donde se presentó el mejor crecimiento (3.3  $\text{gL}^{-1}$ ). Es recomendable cosechar las BAL a las 24 h pues es donde se presenta una mayor productividad. Se observa que existe un efecto por la adición de extracto de germen de malta comparándola con los controles pues el incremento en la productividad es notable lo cual concuerda con lo reportado por Laitila [3]. De acuerdo con el análisis de Pareto de los factores con un mayor efecto negativo sobre la productividad son la concentración de glucosa, acetato de sodio y sulfato de magnesio, probablemente debido a que estas fuentes son nutrientes esenciales para el crecimiento de las BAL; sin embargo, Al realizar el análisis del tamaño del vector, las variables que se recomiendan estudiar con más detalle son el acetato de sodio y de sulfato de magnesio.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y por el Proyecto FONCICYT 273656 (Use of lactic acid bacteria for the control of level of ochratoxin in coffee beans).

## Referencias

1. Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari, H.-I., Roussos, S. (2014). Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control*, 76, 52–59.
2. De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.
3. A. Laitila M. Saarela L. Kirk M. Siika-aho A. Haikara T. Mattila-Sandholm I. Virkajärvi. (2004). Malt sprout extract medium for cultivation of *Lactobacillus plantarum* protective cultures. *Applied Microbiology*. 39(4), 336-340.

## XL ENCUESTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ



## Retos de la ingeniería química para el desarrollo nacional

# AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol.1, No. 1



**Retos de la ingeniería química  
para el desarrollo nacional**

7 al 10 de mayo de 2019, Bahías de Huatulco, Oaxaca, México.

MEMORIAS DEL XL ENCUENTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ

## AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol. 1, No. 1

XL ENCUENTRO NACIONAL  
DE LA AMIDIQ



**“RETOS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA PARA  
EL DESARROLLO NACIONAL”**

Retos de la ingeniería química  
para el desarrollo nacional

Memorias del XL Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Bahías de Huatulco, Oaxaca, México

07 al 10 de Mayo de 2019



AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA, Vol. 1. No. 1, octubre 2020, es una publicación anual de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Canarias 704, Col. Portales, Delegación Benito Juárez, C.P. 03300, Ciudad de México, México. Tel. 3338464060. Página electrónica de la publicación: <https://amidiq.com/avances-en-ingenieria-quimica/> y dirección electrónica: [avancesiq@amidiq.com](mailto:avancesiq@amidiq.com). Editor responsable: Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz. Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo de Título *En Proceso*, ISSN *En Proceso*, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsables de la última actualización de este número: Dr. Miguel Ángel Morales Cabrera, Dra. María del Rosario Enríquez Rosado, Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz, Dra. Nelly Ramírez Corona, Dr. Adrián Bonilla Petriciolet, Dr. Fernando Israel Gómez Castro, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Canarias 704, Col. Portales, Delegación Benito Juárez, C.P. 03300, Ciudad de México, México. Fecha de última actualización: 31 de octubre de 2020. Tamaño del archivo: 138 MB.